

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr diperoleh dari ekstraksi bertingkat dengan tiga macam pelarut secara berturut-turut yaitu n-Heksana, etil asetat dan etanol. Pengujian dilakukan secara *in vitro* dengan metode yang digunakan adalah metode difusi cakram.

4.2. Lokasi Penelitian

Penelitian ekstraksi dan fraksinasi serta skrining fitokimia dilaksanakan di Laboratorium Sintesis, dan uji antifungi dengan difusi cakram dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Malang. Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2019.

4.3. Alat Penelitian

4.3.1. Alat Pembuatan Serbuk Simplisia

1. Mesin penggiling (Blender)
2. Pengayak mesh 20 dan 40
3. Timbangan analitik balance *Scout Pro 400 g*
4. Oven BINDER

4.3.2. Alat Ekstraksi

1. Timbangan analitik balance *Scout Pro 400 g*
2. Gelas ukur
3. Gelas piala 1000 ml *Pyrex Iwaki TE_32*
4. Desikator
5. Cawan Porselen Ø 10 cm
6. Penyaring Buchner 100 mm
7. Batang pengaduk
8. Oven BINDER
9. Pipet tetes
10. Sudip besi 20 cm
11. Erlenmeyer 1000 ml
12. *Rotary evaporator vacuum Buchi R-215*

4.3.3. Alat Identifikasi Senyawa dengan KLT

1. Cawan porselen
2. *Chamber*
3. Lempeng KLT
4. Penampak noda
5. Pinset
6. Pipa kapiler 5 μ l
7. Sinar UV
8. Timbangan analitik balance
9. Vortex (VM-300)
10. Hotplate (streoglass)

4.3.4. Alat Pengujian Difusi Cakram

1. Inkubator
2. Autoklaf
3. Micro pipet
4. Laminar Air Flow
5. Tabung reaksi
6. Hot plate
7. Bunsen
8. Pipet volume
9. Kertas saring
10. Erlenmeyer
11. Penjepit
12. Cawan petri
13. Kawat ose

4.4. Bahan Penelitian

4.4.1. Bahan Uji

Bahan tanaman uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr yang didapatkan dari daerah kota Palangka Raya dan telah diserbukkan oleh UPT. Balai Materia Medika Batu, Dinas Kesehatan, Jawa Timur. Penelitian ini mengambil sampel umbi *Eleutherine*

palmifolia (L.) Merr dengan warna merah keunguan dan ukuran panjang 5 cm dan diameter 3 cm.

Jamur uji adalah *Candida albicans* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Parasitologi Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.2. Sampel Uji

Jamur *Candida albicans* diisolasi pada media Sabouraud Dextrose Agar (SDA) dan disuspensi dalam media Sabouraud Dextrose Broth (SDB) dapat di tempatkan dalam tabung atau plate dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, selama 3 hari tampak koloni *Candida albicans* sebesar kepala jarum pentul, 1-2 hari kemudian koloni dapat dilihat dengan jelas.

4.4.3. Proses Ekstraksi

1. Pelarut Etil asetat
2. Umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.

4.4.4. Identifikasi Senyawa dengan KLT

1. Etil asetat teknik (Bratachem)
2. Asam formiat pro analisis (MERCK)
3. Asam sulfa 10% (MERCK)
4. FeCl₃ 1% (MERCK)
5. Methanol (MERCK)
6. Larutan KOH 10% dalam methanol (MERCK)
7. NaCl 10% (MERCK)
8. Reagen Dragendroff (Bratachem)
9. Reagen Anisaldehyd-Asam Sulfat (Bratachem)
10. Lempeng KLT silica gel 60 F₂₅₄ (MERCK)
11. Aseton (MERCK)
12. Kloroform (MERCK)

4.4.5. Pengujian Difusi Cakram

1. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (OXOID)
2. Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (OXOID)
3. Aquadest steril (OTSU)
4. Nystatin 50 µg/disk sebagai kontrol positif (Metiska Farma)
5. Tween 80 10% (MERCK)

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi Fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr. yang digunakan pada pengujian antijamur dengan metode difusi cakram yaitu, 80 mg/ml, 120 mg/ml, dan 160 mg/ml pada jamur *Candida albicans*.

4.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan oleh senyawa uji. Senyawa uji pada penelitian ini adalah fraksi etil asetat dari umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr. Fraksi etil asetat dari umbi *E. palmifolia* adalah fraksi yang mengandung senyawa uji yang dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* dan sedangkan diameter zona hambat adalah zona bening yang dihasilkan oleh aktivitas senyawa uji fraksi etil asetat dari umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr. dimana besarnya diameter zona bening tersebut menandakan daya hambat dari aktivitas senyawa uji fraksi etil asetat dari umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.

4.6. Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat yang digunakan, terlebih dahulu disterilkan melalui proses sterilisasi, yaitu cara sterilisasi kering dan cara sterilisasi basah.

4.6.1. Sterilisasi Kering

Sterilisasi kering merupakan sterilisasi dengan udara panas dengan oven. Cara ini umum dilakukan untuk mensterilkan peralatan gelas seperti cawan petri, tabung reaksi, dan alat-alat gelas lainnya. Prinsip kerja dari alat ini lebih sederhana pada oven dengan suhu diseting pada angka 160-180°C selama 1-2 jam.

1. Sterilisasi dengan api langsung

Sterilisasi ini dilakukan terhadap peralatan seperti jarum oase, pinset, spatel, mulut tabung biakan dan batang pengaduk.

2. Sterilisasi menggunakan oven pemanas

Oven pemanas digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas yang tidak berskala, seperti cawan petri, tabung reaksi dan pipet. Alat-alat yang disterilkan dimasukkan ke dalam oven setelah suhu 160°C selama 1-2 jam.

4.6.2. Sterilisasi Basah

Sterilisasi basah dilakukan dengan cara autoklaf. Peralatan yang disterilkan diantaranya gelas ukur, Erlenmeyer, dan pipet tetes. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121°C selama 15-20 menit pada medium pembiakan mikroba SDA dan SDB (Hafsan dkk, 2015).

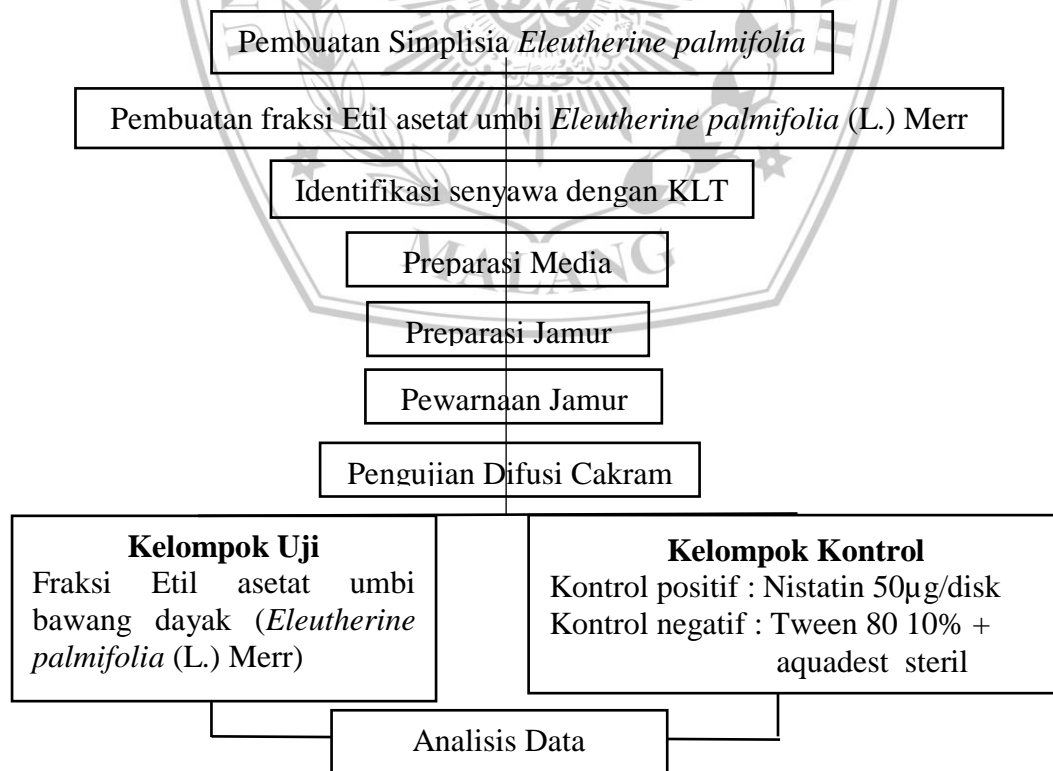
4.7. Metode Penelitian

4.7.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antijamur dengan mengukur daya hambat fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr. terhadap jamur *Candida albicans* secara *in vitro* dengan metode difusi cakram. Penelitian ini melalui beberapa tahapan, yaitu:

1. Preparasi Sampel (Bahan Uji)
2. Penarikan komponen senyawa/Ekstraksi
3. Pemisahan komponen senyawa dengan metode KLT
4. Pengujian antijamur dengan metode difusi cakram

4.7.2. Kerangka Operasional



Gambar 4. 1. Skema kerangka operasional

4.8. Prosedur Kerja

4.8.1. Preparasi Sampel (Bahan Uji)

Sampel yang diteliti adalah umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr. Umbi dibersihkan, ditiriskan, diiris tipis-tipis dan ditimbang, kemudian dikeringkan. Pengeringan pada suhu ruang dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari langsung. Setelah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggilingan, sehingga diperoleh serbuk halus. Selanjutnya diayak menggunakan *Shieve Shaker* dengan derajat kehalusan tertentu (Farmakope Herbal Indonesia, 2008). Kemudian dilakukan pengukuran MC untuk mengetahui kadar air yang masih terdapat dalam ekstrak dengan memasukkan 2 gram ekstrak kering ke dalam alat Moisture Analyze, tekan *enter* pada alat hingga alat berbunyi (replikasi 3 kali).

4.8.2. Proses Ekstraksi Bahan Uji dengan Pelarut Etil Asetat

Pada proses ekstraksi yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah dengan metode maserasi bertingkat dengan menggunakan 3 macam pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol. Dalam pembuatan ekstraknya digunakan serbuk umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr total sebanyak 3,2 kilogram yang diekstraksi dengan pelarut Etil asetat. Pada proses ekstraksi terbagi menjadi 2 sesi, sesi pertama dengan serbuk sebanyak 1,2 kilogram dan sesi kedua dengan serbuk sebanyak 2 kilogram menggunakan metode maserasi perendaman selama 24 jam.

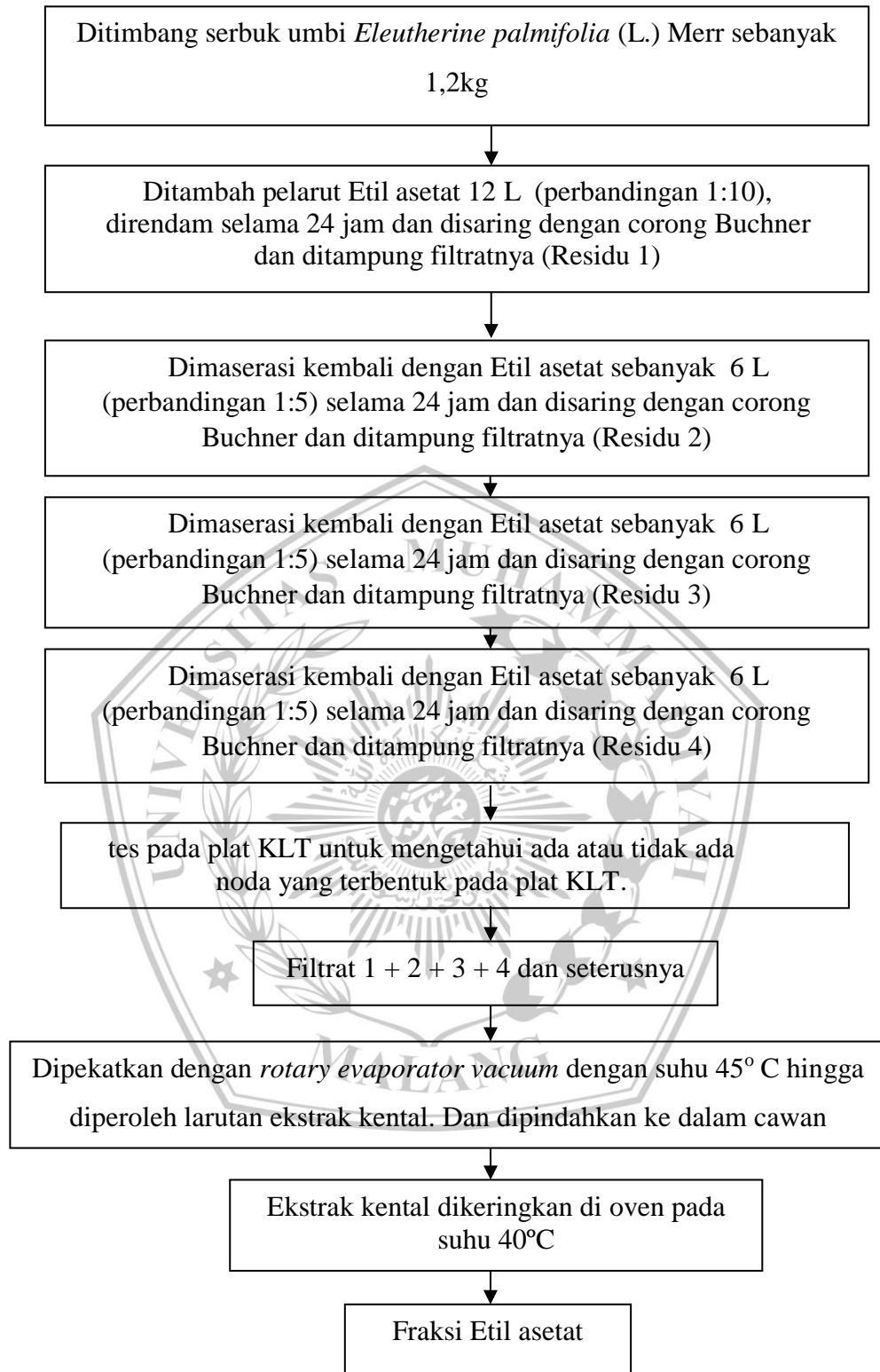
Pada sesi pertama sebagai berikut :

- 1) Serbuk umbi bawang dayak ditambahkan dengan pelarut Etil asetat sebanyak 12 L (perbandingan 1:10), rendam selama 24 jam, kemudian saring dengan corong buchner tampung filtratnya. (Filtrat 1 dan residu 1).
- 2) Residu 1 dimaserasi kembali dengan Etil asetat sebanyak 6 L (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Saring dan tampung filtratnya (filtrat 2 dan residu 2), hingga seterusnya dengan metode yang sama sampai pada filtrat tidak lagi menunjukkan ada komponen yang tertarik dengan pelarut asetat.
- 3) Maserasi dilakukan hingga semua senyawa yang terdapat pada umbi dayak tertarik oleh pelarut Etil asetat. Hal ini ditandai dengan jika dilakukan pada tes pada plat KLT tidak ada noda yang terbentuk pada plat KLT.

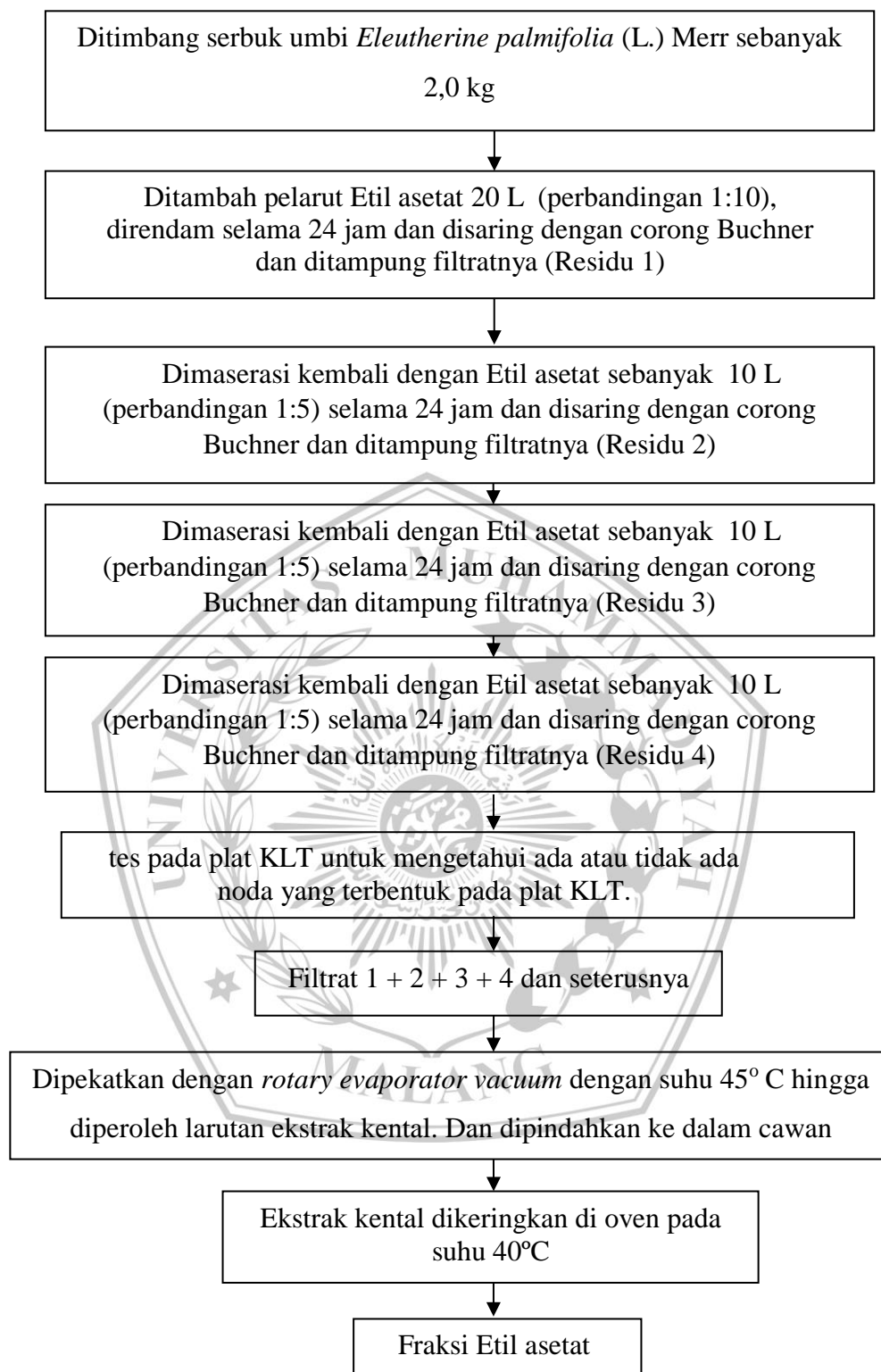
- 4) Filtrat dikumpulkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dengan suhu 45° C sampai diperoleh larutan ekstrak kental.
- 5) Kemudian pindahkan ekstrak kental ke cawan porselen. Ekstrak kental dikeringkan di oven pada suhu 40°C.

Pada sesi kedua sebagai berikut :

- 1) Serbuk umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr ditambahkan dengan pelarut Etil asetat sebanyak 20 L (perbandingan 1:10), rendam selama 24 jam, kemudian saring dengan corong buchner tampung filtratnya. (Filtrat 1 dan residu 1).
- 2) Residu 1 dimaserasi kembali dengan Etil asetat sebanyak 10 L (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Saring dan tampung filtratnya (filtrat 2 dan residu 2), hingga seterusnya dilakukan dengan metode yang sama secara berulang sampai pada filtrate tidak lagi menunjukkan ada komponen yang tertarik dengan pelarut asetat.
- 3) Maserasi dilakukan hingga semua senyawa yang terdapat pada umbi (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) tertarik oleh pelarut Etil asetat. Hal ini ditandai dengan jika dilakukan pada tes pada plat KLT tidak ada noda yang terbentuk pada plat KLT.
- 4) Filtrat dikumpulkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dengan suhu 45° C sampai diperoleh larutan ekstrak kental.
- 5) Kemudian pindahkan ekstrak kental ke cawan porselen. Ekstrak kental dikeringkan di oven pada suhu 40°C.



Gambar 4. 2. Bagan Alir Proses Ekstraksi Bahan Uji dengan Pelarut Etil asetat Sesi Pertama



Gambar 4. 3. Bagan Alir Proses Ekstraksi Bahan Uji dengan Pelarut Etil asetat Sesi Kedua

4.8.3. Pemisahan Senyawa dengan KLT

Ekstrak Etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr ditimbang sebanyak 50 mg, dilarutkan dalam 1 ml Etil asetat pada wadah tertutup rapat, kemudian di vortex selama 30 menit. Totolkan sebanyak satu kapiler (5 μ l) pada lempeng KLT, kemudian dieluasi dengan berbagai macam fase gerak.

Pemilihan eluen n-heksan, kloroform dan etil asetat memiliki alasan bahwa eluen tersebut cenderung stabil dan memiliki viskositas yang rendah, selain itu kombinasi eluen tersebut memberikan selektifitas yang memadai untuk campuran bahan yang akan dipisahkan khususnya pada penelitian ini bersifat semipolar. Eluen dipilih pada konsentrasi yang sesuai dengan sampel yang dipisahkan agar kromatografi dapat berjalan dengan baik. pemilihan kombinasi eluen ditujukan agar tidak memberikan hasil yang bervariasi.

1. Fase diam : silica gel TLC 60 F254

2. Optimasi fase gerak

Etil asetat : N-heksan (7:3)

Etil asetat : N-heksan (4:6)

Etil asetat : Kloroform (5:5)

4.8.4. Identifikasi Komponen Senyawa

Komponen senyawa yang sudah dipisahkan dengan metode KLT dilakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak Etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr dengan penampak noda sebagai berikut :

Alkaloid : dragendorff (noda berwarna jingga)

Terpenoid : anisaldehida-asam sulfat. Panaskan lempeng pada suhu 100° C selama 5-10 menit (noda berwarna ungu)

Flavonoid : uap amonia atau asam sulfat 10% (noda berwarna kuning intensif)

Polifenol : besi (III) klorida 1% (noda berwarna hitam)

Antraknon : larutan kalium hidroksida 10% dalam etanol (noda berwarna jingga atau merah)

4.8.5. Persiapan Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

Berdasarkan dari penelitian sebelumnya konsentrasi tiap tanaman sebagai antijamur menggunakan fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr untuk jamur *Candida albicans* konsentrasi yang dipakai adalah sebagai berikut:

- a. Konsentrasi 1 : Fraksi Etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr 80mg/ml
- b. Konsentrasi 2 : Fraksi Etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr 120mg/ml
- c. Konsentrasi 3 : Fraksi Etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr 160mg/ml

4.8.6. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

Langkah-langkah pembuatan konsentrasi larutan uji dibuat sebagai berikut:

1. Ditimbang bawang dayak 80 mg kemudian ditambahkan Tween 80 10% dengan melarutkan 0,1 ml Tween 80 dalam aquades steril sampai 1 ml, Sehingga diperoleh larutan uji konsentrasi 8% dari fraksi Etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* (L.)
2. Ditimbang bawang dayak 120 mg kemudian ditambahkan Tween 80 10% dengan melarutkan 0,1 ml Tween 80 dalam aquadest steril sampai 1 ml, Sehingga diperoleh larutan uji konsentrasi 12% dari fraksi Etil asetat *Eleutherine palmifolia* (L.)
3. Ditimbang bawang dayak 160 mg kemudian ditambahkan Tween 80 10% dengan melarutkan 0,1 ml Tween 80 dalam aquades steril sampai 1 ml, Sehingga diperoleh larutan uji konsentrasi 16% dari fraksi Etil asetat *Eleutherine palmifolia* (L.)

4.8.7. Pembuatan Media

Dalam penelitian ini digunakan dua media yakni *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dan *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB).

A. Pembuatan *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dengan Mensuspensikan 65 gram medium dalam satu liter air destilata, kemudian direbus selama 1 menit. Setelah itu di tempatkan ke dalam autoklaf pada suhu 121 ° C selama 15 menit. Dinginkan hingga 45 hingga 50 ° C dan tuang ke masing-masing cawan petri pada ruangan LAF (Rijal, 2015).

B. Pembuatan Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) dengan Mensuspensikan 30 gram medium dalam satu liter air destilata, kemudian direbus selama 1 menit. Setelah itu di tempatkan ke dalam autoklaf pada suhu 121 ° C selama 15 menit. Simpan pada suhu 2 sampai 8° C.

4.8.8. Pembuatan Standar Mc Farland

Mc Farland digunakan untuk standardisasi perkiraan jumlah antimikroba pada larutan suspensi dengan membandingkan kekeruhan suspensi dengan standar McFarland dengan menggunakan larutan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1% menghasilkan lapisan endapan berupa barium sulfat (BaSO₄) (Haris dkk, 2013). Standar yang paling umum digunakan di laboratorium mikrobiologi klinik adalah Standard McFarland 0.5, yang digunakan untuk pengujian kerentanan antimikroba dan pengujian kinerja media kultur.

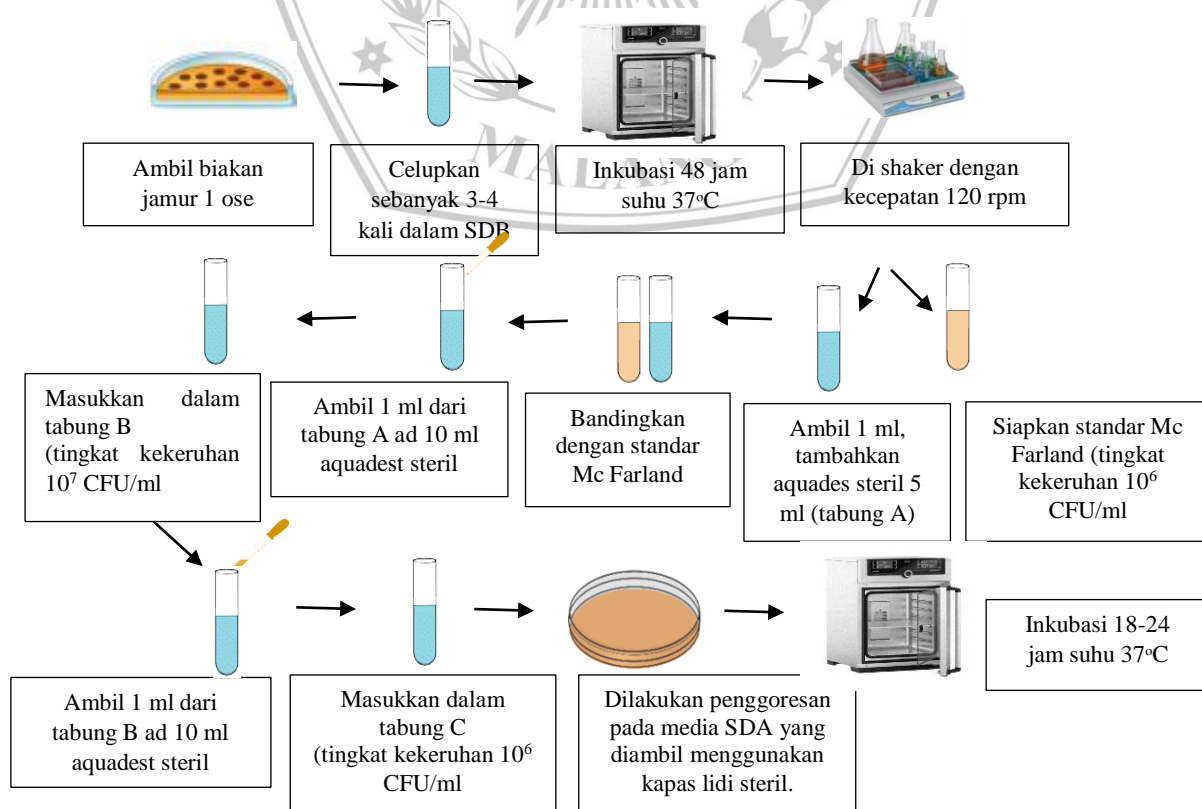
Diambil aquadest kira-kira setengah dari tabung reaksi. Kemudian tambahkan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95ml dan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05ml. Campuran kedua larutan dalam tabung tersebut, kocok sampai homogen dan terbentuk larutan keruh. Larutan ini merupakan standar McFarland 0,5 ekuivalen sebagai suspensi mikroba uji yang konsentrasinya 1,4x10⁶ CFU/ml dan digunakan sebagai pembanding (Anonim, 2014).

Tabel IV. 1. Standard Mc Farland

Species	CFU/ml ^b	Cells/field ^c
<i>T. mucoides</i>	4.5 x 10 ⁶	<1
<i>Rhodotorula spp.</i>	1.9 x 10 ⁶	4-5
<i>C. tropicalis</i>	3.3 x 10 ⁶	5-6
<i>S. cerevisiae</i>	1.2 x 10 ⁶	<1
<i>C. parapsilosis</i>	1.3 x 10 ⁶	4-5
<i>C. glabrata</i>	4.3 x 10 ⁶	>20
<i>C. albicans</i>	1.4 x 10 ⁶	<1
<i>C. kefyr</i>	2.1 x 10 ⁶	>10
<i>C. krusei</i>	3.1 x 10 ⁶	2-3
<i>T. inkin</i>	1.4 x 10 ⁶	<1

4.8.9. Preparasi Jamur

Proses peremajaan jamur diperoleh dari biakan murni sebanyak satu ose yang dicelupkan kedalam tabung sebanyak 3-4 kali yang berisi media SDB, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Sebelum membuat suspensi jamur, standar McFarland disiapkan terlebih dahulu dengan tingkat kekeruhan 10^6 CFU/ml. Dilakukan pembuatan suspensi jamur dengan teknik dilusi (pengenceran). Jamur uji diambil dari hasil peremajaan menggunakan pipet dan dimasukkan kedalam 5 ml aquadest steril (tabung A), dikocok menggunakan *shaker* dan dibandingkan dengan standar McFarland 10^6 CFU/ml. Jika kekeruhan sudah sama maka dapat dilakukan pengenceran hingga didapatkan jumlah koloni jamur yang diinginkan yaitu 10^6 CFU/ml. Pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 ml dari tabung A kemudian dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml (tabung B) dan didapat jumlah koloni 10^7 CFU/ml, kemudian diambil 1 ml dari tabung B dan dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml (tabung C) dan didapat koloni 10^6 CFU/ml. Kemudian dari tabung C dilakukan penggoresan pada media SDA yang diambil menggunakan kapas lidi steril dan digoreskan dengan 3-4 bagian secara horizontal, lalu putar cawan 90°. Lanjutkan goresan sampai merata. Jamur diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.



Gambar 4. 4 Gambar preparasi jamur

4.8.10. Pewarnaan Jamur Uji

Perwarnaan jamur dilakukan untuk identifikasi dan untuk memastikan tidak ada kontaminan pada kultur kerja. Objek kaca yang digunakan dibersihkan dengan alkohol 96% dan dikeringkan. Kemudian tambahkan aquadest 1 tetes di atas objek kaca, dan ambil biakan jamur yang akan dilakukan pewarnaan dengan ose steril (biakan jamur yang diambil 1 koloni), kemudian ratakan biakan jamur di permukaan objek kaca yang telah berisi aquadest. Difiksasi dengan api bunsen (lewatkan di atas api 2-3 kali). Setelah kering, pertama ditetesi dengan pewarna LPCB *Lactophenol Cotton Blue* kemudian tunggu 1 menit lalu bilas dengan aquadest kemudian keringkan dengan tisu. Periksa dengan mikroskop (perbesaran 100 x 10). Dilihat bentuk fisik jamur uji seperti tunas, hifa dan pseudohifa (Hafsan dkk, 2015). Pewarnaan pada jamur juga berfungsi untuk memastikan jamur uji yang digunakan tidak terkontaminasi mikroba lainnya.

4.8.11. Preparasi Kontrol Positif

Pada penelitian ini menggunakan kontrol positif Nistatin dengan konsentrasi 50 µg/disk. *Paper discs* cakram kertas direndam selama 20 menit pada kontrol positif. Cakram kertas dikeringkan di oven selama 5 menit. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

4.8.12. Pengujian Antijamur Dengan Difusi Cakram

Prosedur pengujian pada jamur *Candida albicans* secara difusi cakram dilakukan sebagai berikut :

1. Disiapkan tabung yang telah berisi larutan uji masing-masing dengan dosis yang telah ditentukan, serta kontrol negatif dan kontrol positif. Fraksi etil asetat umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr), Nistatin digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif menggunakan Tween 80 10% + aquadest.
2. Dibuat larutan uji fraksi etil asetat umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) dengan konsentrasi 80 mg/ml, 120 ml/, 160 mg/ml. Cakram kertas (*Paper disk*) diletakkan diatas kaca arloji kemudian ditetesi dengan larutan uji sebanyak 20µl kemudian dikeringkan

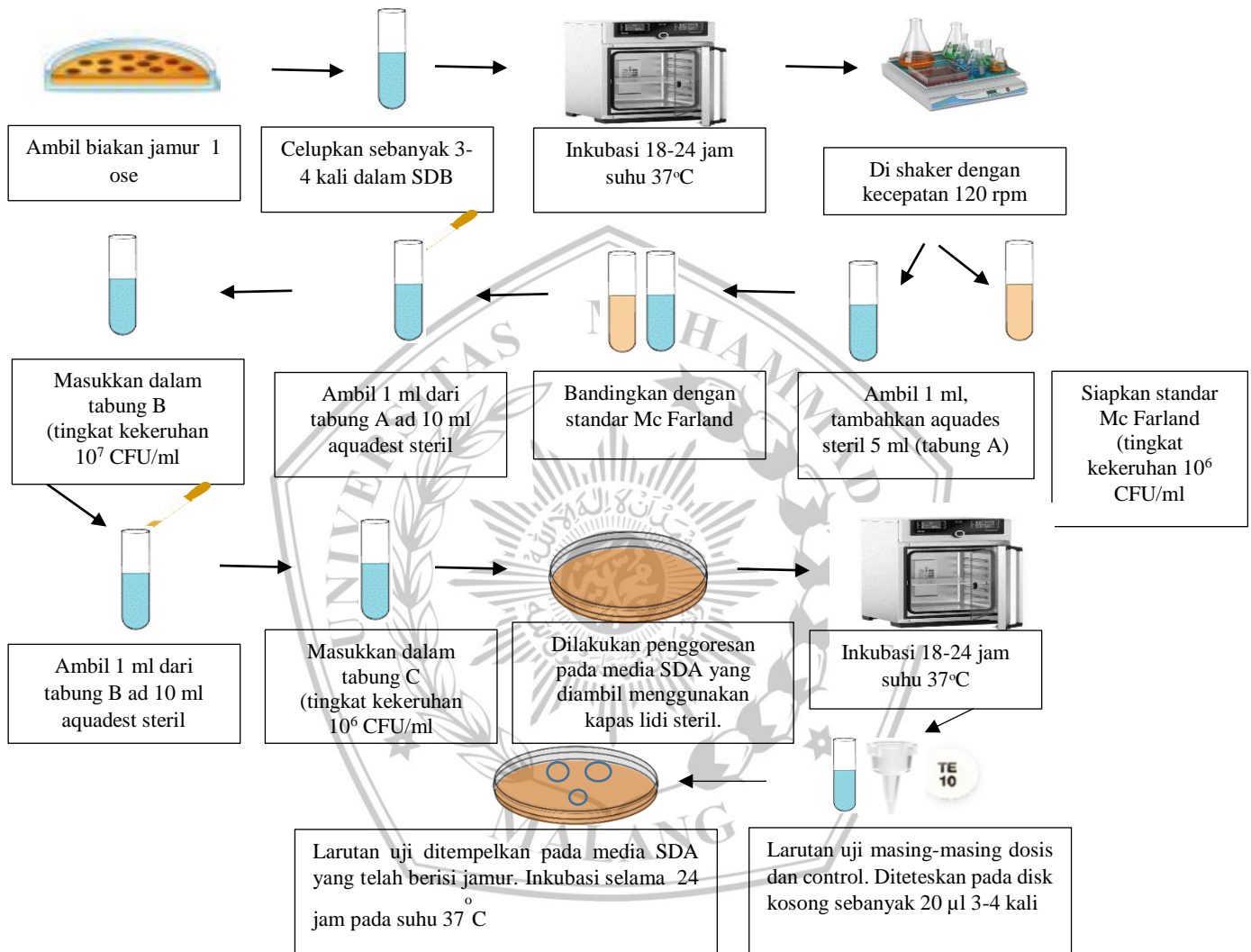
menggunakan oven. Lakukan pengulangan sebanyak 4x sehingga jumlah yang ditetesi mencapai 80 μ l.

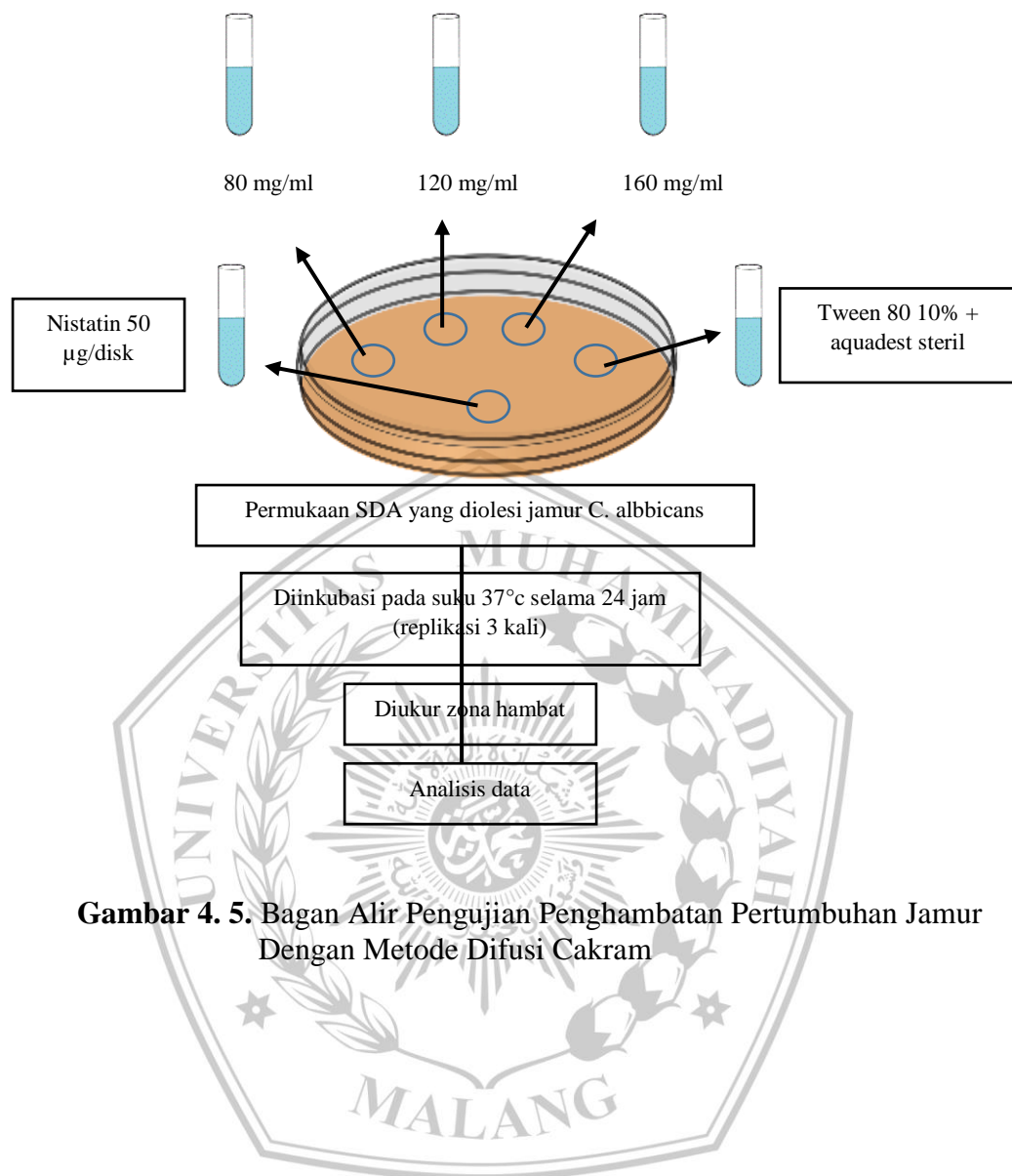
3. Pembiakan jamur pada cawan petri menggunakan teknik *streak plate* atau cara goresan. Prinsip metode ini yaitu mendapatkan koloni yang benar-benar terpisah dari koloni yang lain, sehingga mempermudah proses isolasi. Cara ini dilakukan dengan membagi 3-4 cawan petri. Ose steril yang telah disiapkan diletakkan pada jamur uji yang telah dicampur dengan *Sabouraud Dextrose Broth*, kemudian menggoreskan ose tersebut pada cawan petri berisi media steril. Goresan dapat dilakukan 3-4 kali membentuk garis horisontal disatu cawan. Ose disterilkan lagi dengan api bunsen. Setelah kering, ose tersebut digunakan untuk menggores goresan sebelumnya pada sisi cawan ke dua. Langkah ini dilanjutkan hingga keempat sisi cawan tergores.
4. Cakram kertas dengan diameter 6 mm yang telah berisi konsentrasi 80 mg/ml, 120 ml/, 160 mg/ml diletakkan diatas permukaan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) secara aseptis didalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang menyala. Jarak cakram dengan tepi plate tidak kurang dari 15mm. Jarak cakram dengan cakram tidak kurang dari 24mm. Sekali cakram sudah ditempelkan pada agar, tidak boleh digeser atau dipindahkan. Cakram kertas ditekan lembut dengan menggunakan pinset pada permukaan lempengan media sehingga terdapat kontak yang baik antara cakram kertas dan lempengan agar.
5. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Pengujian antifungi dilakukan dengan pengamatan 24 jam dengan melihat adanya zona (area) jernih disekitar cakram kertas. Zona (area) hambatan yang terbentuk diukur dengan penggaris dalam satuan milimeter (mm).
7. Dilakukan pengulangan uji sebanyak 3 kali.

4.9. Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan melakukan pengamatan terhadap pengukuran diameter zona hambat dari daerah berwarna bening dari masing-masing komponen senyawa yang telah dipisahkan pada fraksi etil asetat

umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) pada masing-masing konsentrasi uji terhadap jamur *Candida albicans*.





Gambar 4. 5. Bagan Alir Pengujian Penghambatan Pertumbuhan Jamur Dengan Metode Difusi Cakram